Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

UNTERSUCHUNG ÜBER DEN STOFFWECHSEL VON 3-ACETYLPYRIDIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1965

vorgelegt von
Thomas Richmond Harris
aus Long Beach, California, U.S.A.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Untersuchung über den Stoffwechsel von 3-Acetylpyridin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Richmond H a r r i s
aus Long Beach, California, U.S.A.

Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm M a ß h o f f

Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Helmut C o p e r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 25.11.1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Karl S p o r e r sen. gewidmet

Danksagung

Herrn Professor Dr. H. HERKEN, Direktor des Pharmakologischen Instituts der Freien Universität Berlin, danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Herrn Privatdozent Dr. V. NEUHOFF danke ich für wertvolle Ratschläge und Diskussionen.

Untersuchung über den Stoffwechsel von 3-Acetylpyridin

Inaugural-Dissertation von Thomas Harris

	Seite
Einleitung	1
I. Isolierung und Identifizierung von 3-Acetyl-6-pyridon und N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon	1-15
a) Isolierung der Metaboliten	1- 4
b) Identifizierung der Metaboliten	4-15
II. 3-Acetyl-6-pyridon im Organismus	15-31
A. Methode	15-21
1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 3-Acetyl-6-pyridon	15-19
2. Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon aus Organen	19-21
B. Ergebnisse	21-31
1. Verteilung von 3-Acetyl-6-pyridon im Organismus	21-24
2. Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon mit dem Urin	24-25
3. Bildung von 3-Acetyl-6-pyridon nach wiederholter Gabe von 3-Acetylpyridin	25-27
4. Bildung und Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon nach Vorbehandlung mit Luminal	27-30
5. In vitro Synthese von 3-Acetyl-6-pyridon in isolierten Zellfraktionen	31
III. Diskussion	32-35
IV. Zusammenfassung	36
V. Literaturverzeichnis	37-41
VI. Lebenslauf	

Bei allen bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen über die Wirkung von 3-Acetylpyridin (3-AP) als Antimetabolit des Nicotinamids (Übersicht bei COPER und HERKEN, 1963; HERKEN, 1965) stand der Austausch von Nicotinamid gegen 3-Acetylpyridin in den oxydierten Pyridinnucleotiden im Vordergrund des Interesses. Der Grund dafür ist sicher darin zu sehen, daß die nach der Applikation von 3-AP auftretenden, vorwiegend zentralnervösen Intoxikationserscheinungen in erster Linie auf die Bildung von Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat (APADP) zurückzuführen sind (HERKEN u. NEUHOFF, 1963; WILLING, NEUHOFF u. HERKEN, 1964).

Bei Untersuchungen über die Verteilung und Ausscheidung von 3-AP im Organismus ist aufgefallen (NEUHOFF, 1964), daß der größte Teil der applizierten ^{14}C-Aktivität mit dem Urin ausgeschieden wird, ohne daß unverändertes 3-AP im Urin der Versuchstiere nachgewiesen werden konnte. Bei der dünnschichtchromatographischen Fraktionierung des Urins und anschließender Autoradiographie waren wenigstens 12 verschiedene radioaktive Verbindungen nachweisbar. In der Literatur, die über den Stoffwechsel von 3-AP berichtet (BEHER et al. 1952, 1953, 1959; McKENNIS et al. 1964; KANIG u.a. 1964), sind bisher erst 2 Metaboliten des 3-AP beschrieben, die direkt aus dem Stoffwechsel des 3-AP stammen. Andere Metaboliten, wie Nicotinamid, N-Methylnicotinamid und Nicotinsäure entsprechen der Umsetzung von 3-AP zu Nicotinamid bzw. Nicotinsäure. Wir haben daher versucht, weitere Metaboliten des 3-AP zu isolieren und identifizieren, um möglicherweise nähere Aufschlüsse über den Stoffwechsel dieser Verbindung zu erhalten.

I.) Isolierung und Identifizierung von 3-Acetyl-6-pyridon und N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon.

a) Isolierung der Metaboliten

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Metaboliten wurde Rattenurin verwandt. 60 weiße Ratten erhielten 100 mg/kg 3-AP i.p. Zur Anregung der Diurese bekamen die Tiere anschließend 10 ml Wasser durch eine Schlundsonde in den Magen instilliert. Die Tiere wurden dann einzeln in Stoffwechselkäfige

gesetzt, so daß ihr Urin über einen Trichter vollständig in Meßzylindern aufgefangen werden konnte. Der Urin wurde über eine Periode von 8 - 10 Stunden gesammelt und durch Vakuumdestillation bei 30 - 40°C auf ca. 100 ml eingeengt. Der Sammelurin wurde mit dem Urin von zwei Tieren vermischt, die 100 mg/kg ^{14}C-3-AP mit einer spezifischen Aktivität von 8,4 µC/mg erhalten hatten (Präparat von Dr.M.Schmidt, Farbwerke HOECHST, Frankfurt/M). Der Gesamturin hatte danach eine Aktivität von 7,1 x 10^7 IpM.

Zunächst wurde versucht, das Urinkonzentrat mit Aktivkohle (Merck) zu reinigen. In den mit Eisessig auf pH 4 eingestellten Urin wurden ca. 5 g Kohle eingebracht, nach wiederholtem Schütteln über eine G-4 Fritte abgesaugt und die Kohle mehrfach mit Wasser nachgewaschen. Im Filtrat und Spülwasser fanden sich mit 6,2 x 10^5 IpM weniger als 1 % der Gesamtaktivität, die verworfen wurde. Anschließend wurde die im Exsiccator getrocknete Kohle nacheinander mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln über eine G-4 Fritte eluiert. Zur Anwendung kamen Chloroform, Benzol, Aceton, Äthanol, Methanol. Die Eluate wurden durch Vakuumdestillation eingeengt, und ein aliquoter Teil jeder Fraktion wurde auf einer Dünnschichtplatte aus Kieselgel G mit Benzol, Methanol, Aceton, Eisessig (70/20/5/5) als Lösungsmittel chromatographiert. Wie das Autoradiogramm dieser Platte mit einem Gevaert Osray Film ergab, war keine eindeutige Fraktionierung erreicht worden. Die organischen Phasen wurden daraufhin vereint, bis zur Trockne abdestilliert und der Rückstand in H_2O aufgenommen. Ein großer Teil der ^{14}C-Aktivität war nach dieser Extraktion noch an der Kohle adsorbiert. Deshalb wurde die Kohle in einem Soxhlet-Apparat mit einer Mischung aus Äthanol, Methanol, H_2O, NH_4OH erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wurde nach Vakuumdestillation mit dem organischen Kohleeluat vereint. Dadurch wurden ca. 98 % der an Kohle adsorbierten ^{14}C-Aktivität wiedergewonnen.

Diese aktive Fraktion wurde auf eine Kationenaustauschersäule gebracht. Die Säule mit einem Durchmesser von 2 cm war in einer Höhe von 75 cm mit Dowex 50 x 8 in der H-Form gefüllt. Mit einem Fraktionssammler wurden je 10 ml in Reagenzgläsern gesammelt und in einem Beckman DB Spektrophotometer bei 280 und 260 mµ die Extinktion jeder einzelnen Fraktion gemessen.

Zunächst wurde solange mit H_2O gespült, bis keine UV-Absorption im Durchlauf mehr meßbar war. Anschließend wurde über einen mit Wasser gefüllten, 1 Liter fassenden Mischer eine Gradientenelution mit HCl durchgeführt. Das dadurch erhaltene Ionenaustauschchromatogramm zeigt Abb. 1. Im Säulendurchlauf und Wassereluat fanden sich ca. 30 % der auf die Säule gebrachten ^{14}C-Aktivität. Die restlichen 70 % verteilten sich auf die mit steigender HCl-Konzentration eluierbaren Fraktionen.

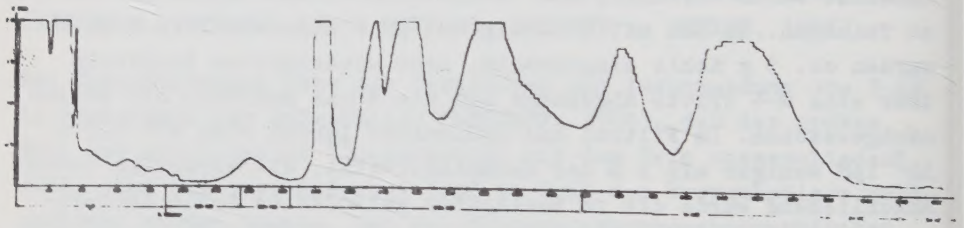

Abb. 1: Ionenaustauschchromatogramm von Rattenurin an Dowex 50x8.

In den Fraktionen 40 - 70 war fast die ganze mit Wasser eluierbare Radioaktivität enthalten. Sie wurden vereint und durch vorsichtige Vakuumdestillation eingeengt. Ein aliquoter Teil des Konzentrates wurde durch Papierchromatographie mit Whatman Nr. 1 Papier und dem Lösungsmittel n-Butanol - Äthanol - Wasser - NH_4OH (4 : 1 : 1 : 1) weiter aufgetrennt. Von den sechs gut voneinander abgesonderten Fraktionen war eine sehr radioaktiv und eine weitere nur minimal aktiv. Daraufhin wurde die gesamte Fraktion auf ca. 200 Papierbogen aufgetragen und aufsteigend mit dem gleichen Lösungsmittel entwickelt. Anschließend wurden die Bogen getrocknet, unter einer UV-Lampe die Fraktionen markiert, die beiden aktiven Komponenten ausgeschnitten und absteigend mit H_2O eluiert. Die entsprechenden Eluate wurden vereint, durch Vakuumdestillation konzentriert und durch Chromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln auf Einheitlichkeit geprüft. Dabei erwiesen sich beide Verbindungen als einheitlich. Die aktivere Substanz repräsentierte ca. 25 % der im Urin enthaltenen Radioaktivität, die schwach aktive Fraktion nur 0,3 %. Wir haben daraufhin zunächst die aktivere Verbindung zu identifizieren versucht und zu diesem Zweck die einheitliche Fraktion noch einmal

vollständig auf mit Wasser vorgewaschenem Whatman Nr. 1 Papier zur Reinigung rechromatographiert.

b) Identifizierung der Metaboliten.

Das UV-Spektrum der in Wasser gelösten Substanz zeigt Abb. 2. Bei neutralem und saurem pH hat sie ein Maximum bei 275 mμ, das sich bei alkalischem pH unter gleichzeitiger Extinktionszunahme nach 312 mμ verschiebt. Eine Tüpfelprobe mit

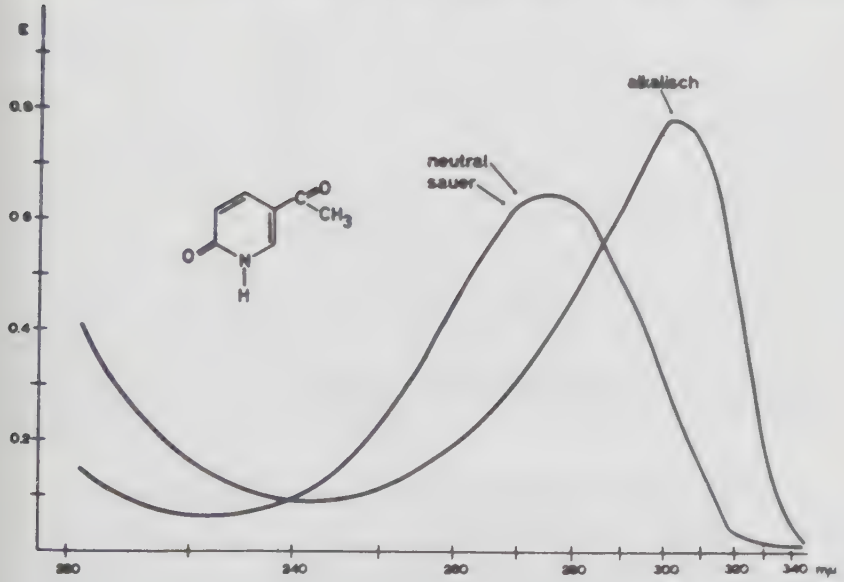

Abb. 2: UV-Spektrum von 3-Acetyl-6-Pyridon.

2,4-Dinitrophenylhydrazin auf Ketogruppen ergab mit deutlicher Gelbfärbung eine positive Reaktion. Auch die Chinonprobe auf Pyridin fiel positiv aus. In einem Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G lief die Substanz fast in gleicher Höhe wie 6-Hydroxypyridin (Abb. 3).

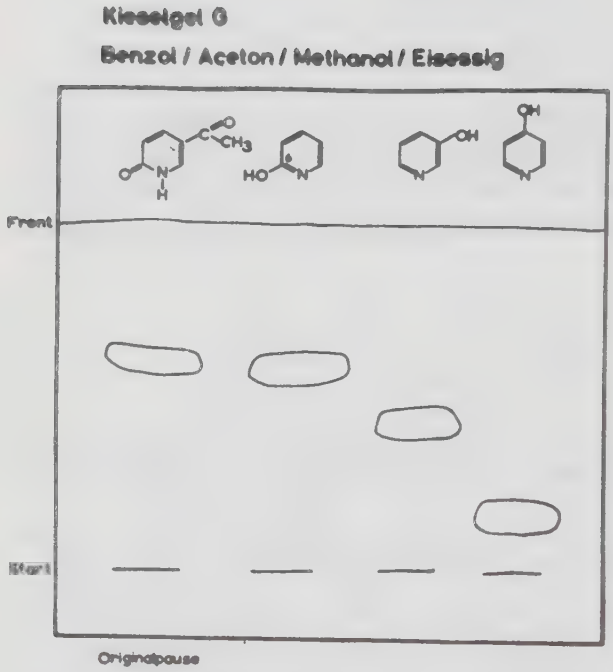

Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm von 3-Acetyl-6-Pyridon, 3-, 4- und 6-(2-) Pyridon.

Das UV-Spektrum der isolierten Verbindung unterschied sich jedoch vollständig von dem des 6-Hydroxypyridins und hatte auch keinerlei Ähnlichkeit mit dem UV-Spektrum von 3-Acetylpyridin. N-Methyl-3-carboxamid-6-Pyridon, das als Stoffwechselprodukt aus 3-AP über Nicotinamid hätte entstehen können, hat gleichfalls ein völlig differierendes UV-Spektrum und bei der Dünnschichtchromatographie einen kleineren R_f-Wert. Auf Grund dieses Verhaltens war anzunehmen, daß es sich bei der isolierten radioaktiven Substanz um eine Pyridinverbindung handeln muß, die in der 3-Position noch das ^{14}C-Atom des 3-AP enthielt und entweder in der Seitenkette, am Stickstoff oder im Pyridinring ein Sauerstoffatom trug, das eine positive Ketonreaktion verursachen kann.

Um zu prüfen, in welcher Form der Stickstoff bei der Pyridinverbindung vorliegt, haben wir eine von HERKEN und NEUHOFF (1963) angegebene Reaktion durchgeführt, die mit N-Methyl-3-acetylpyridin bzw. APAD oder APADP ein spezifisches Fluoreszenzspektrum liefert. Das Prinzip dieser Methode wurde von HUFF (1947) für N-Methyl-Nicotinamid angegeben und beruht darauf, daß durch Anlagerung von Aceton bei alkalischem pH ein Doppelringsystem erzeugt wird, das auf Grund der Lage seiner Doppelbindungen zu spezifischer Fluoreszenz angeregt werden kann. Nach HERKEN und NEUHOFF ist der Ringschluß zwischen der Acetylgruppe in Position 3 des Pyridinringes und dem C_2-Atom nur dann möglich, wenn an dem Pyridin-N ein Rest (z.B. $-CH_3$ oder Ribose) angelagert ist. Trägt der Pyridin-N keinen Substituenten, ist auch keine charakteristische Fluoreszenz meßbar. Die gleichen Autoren haben gleichzeitig eine Methode angegeben, mit der es leicht möglich ist, während der Reaktion auch den Pyridin-N zu methylieren und auf Grund von Vergleichsmessungen zwischen 3-Acetylpyridin und N-Methyl-3-acetylpyridin zu unterscheiden. Wir haben diese Reaktionen mit einer kleinen Probe der Reinsubstanz durchgeführt und dabei festgestellt, daß der Pyridinstickstoff noch additionsfähig war.

Die wässrige Lösung der radioaktiven Verbindung wurde im Exsiccator getrocknet. Dabei bildeten sich gelblich-braune Kristallnadeln. Von 0,3 mg der Substanz wurde ein Infrarotspektrum in Kaliumbromid aufgenommen (Herrn Dr. CLEVE, Physikalisch-chemische Abteilung der Fa. SCHERING AG, Berlin, danke ich für die Aufnahme der Infrarotspektren und für potentiometrische Titrationen). Abb.4 zeigt das IR-Spektrum, das sich eindeutig von dem Spektrum von 3-AP, 2-Pyridon, 3-Pyridon, 4-Pyridon und N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon unterschied. Es bestätigte zwar das Vorliegen von mindestens einer Carboxylgruppe, erlaubte aber keine endgültige Strukturaufklärung, da sich in der Literatur kein Vergleichsspektrum auffinden ließ. Der Vergleich mit dem IR-Spektrum des 3-Acetylpyridins machte es aber wahrscheinlich, daß die Acetylgruppe der Pyridinverbindung noch unverändert erhalten war. Da die radioaktive Substanz sich aber in allen Reaktionen vom 3-AP

und ebenso vom N-Methyl-3-AP unterschied, mußte angenommen werden, daß an einem C-Atom des Pyridinringes eine Substitution erfolgt war.

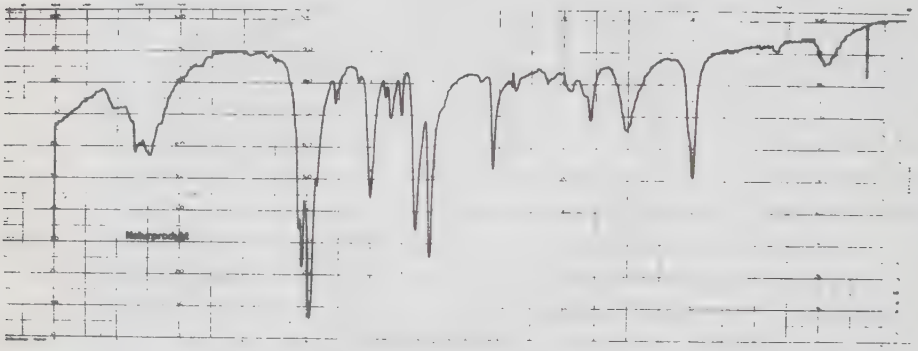

Abb. 4: Infrarot-Spektrum der ^{14}C-Verbindung (3-Acetyl-6-Pyridon)

Bei der Schmelzpunktbestimmung der Kristallnadeln mit einem Kofler-Schmelzpunktsmikroskop ist aufgefallen, daß ein Teil der Substanz bei 134°C sublimierte und ein brauner nicht schmelzender Rückstand auf dem Objektträger blieb. Das Sublimat bildete feinste Nadeln, die im polarisierten Licht orangerot leuchteten. Daraufhin wurde eine Mikro-Vakuumsublimation einer etwas größeren Probe durchgeführt. Die trockene Substanz kam in einen 100 ml Rundkolben, der mit einem Schliffansatz so verschlossen war, daß ein Kühlfinger bis knapp über die Probe reichte und gleichzeitig ein Wasserstrahlpumpenvakuum angelegt werden konnte. Die Apparatur wurde in einem Sandbad unter ständiger Temperaturkontrolle vorsichtig mit einem Bunsenbrenner erwärmt. Bei ca. 80°C begann sich ein rein-weißer Niederschlag am Kühlfinger zu bilden. Daraufhin wurde die Temperatur und das Vakuum über mehrere Stunden unverändert belassen. Nach Abkühlen der Apparatur wurde das Vakuum abgelassen, der Kühlfinger vorsichtig aus dem Kolben gehoben und der weiße Niederschlag vom Kühlfinger abgeschabt. Die bei der Vakuumsublimation eingesetzte Radioaktivität fand sich quantitativ am Kühlfinger niedergeschlagen, während der braune Rückstand im Kolben inaktiv war.

Sowohl das UV- als auch das IR-Spektrum des Sublimates waren mit den zuvor aufgenommenen Spektren identisch. Da auch die 2-, 3- und 4-Pyridone sublimieren, haben wir auf Grund der bisher vorliegenden Befunde vermutet, daß es sich bei der isolierten radioaktiven Verbindung um ein 3-Acetylpyridon handeln könnte. Diese Verbindung hätte ein Molekulargewicht von 137 und die folgende Verteilung für C, H, N und O:

C : 61,3; H : 5,15; N : 10,2; O : 23,2.

Die Elementaranalyse der Substanz (Dipl.-Ing. J. Huber, Hauptlaboratorium der SCHERING AG, Berlin) ergab:

C : 58,21; H : 5,25; N : 10,98,

also keine vollständige Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert. Um Substanz zu sparen, wurde auf die Sauerstoffbestimmung verzichtet.

Das Ergebnis von zwei potentiometrischen Titrationen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln zeigt Abb. 5 und 6.

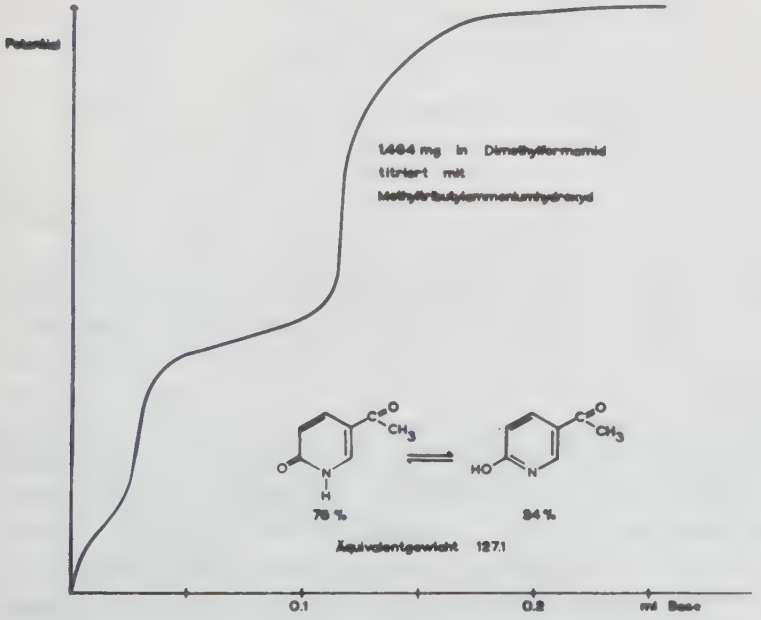

Abb. 5: Potentiometrische Titration von 3-Acetyl-6-Pyridon in Dimethylformamid

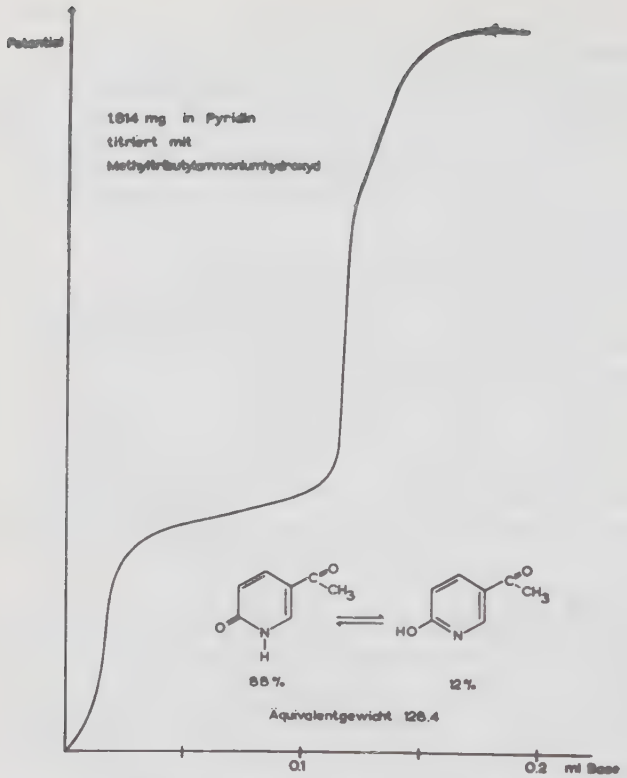

Abb. 6: Potentiometrische Titration von 3-Acetyl-6-Pyridon in Pyridin.

Die Titrationskurven lassen zwei pH-Sprünge erkennen. Das legte die Vermutung nahe, daß es sich um ein 2- oder 6-Pyridon des 3-AP handeln könnte. In den verschiedenen Lösungsmitteln liegt die Verbindung in einem jeweils verschiedenen Gleichgewichtszustand zwischen den tautomeren Formen -OH und =N-H vor. Das ist nur bei einem 2- oder 6-Pyridon, nicht aber bei einem 4-Pyridon oder 5-Pyridon möglich. Die aus den Titrationskurven errechneten Äquivalentgewichte ergaben Werte von 128,4 und 127,1. Das Äquivalentgewicht der isolierten Substanz ist ebenso wie die Werte der Elementaranalyse etwas zu niedrig für das vermutete Pyridon. Das kann darauf zurückzuführen sein, daß bei der Vakuumdestillation trotz vorsichtigen Erwärmens ein kleiner Teil des Moleküls zerstört wurde und die Bruchstücke sich mit dem intakten Molekül am Kühlfinger niederschlugen.

Von dem radioaktiven Sublimat wurde mit einem Varian DP 60 ein Kernresonanzspektrum aufgenommen (Abb. 7, oben). (Herrn Dr. ARNDT, Organ.Chem. Inst. d. Technischen Universität, Berlin, danke ich für die Aufnahme dieser Spektren.)

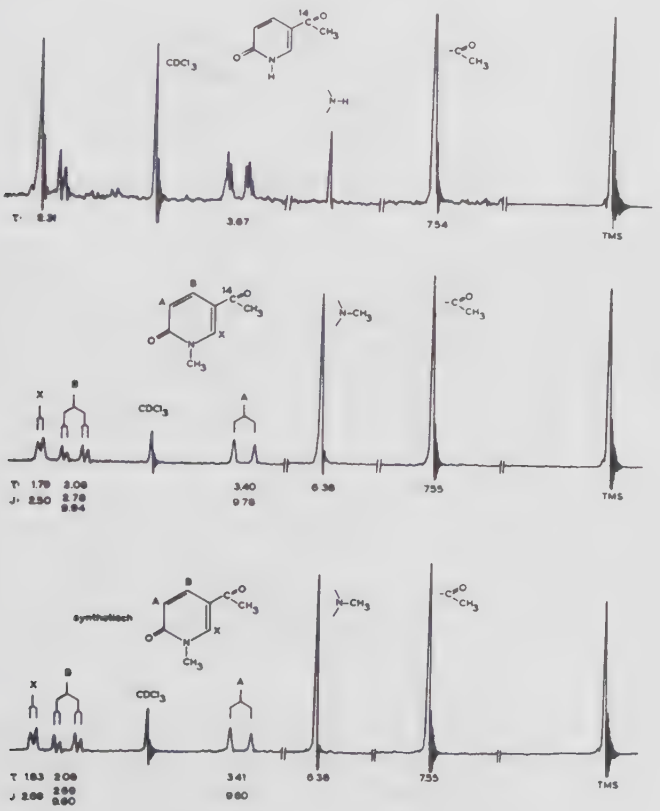

Abb. 7: Kernresonanzspektren; aufgenommen mit einem Varian DP 60. Lösungsmittel Deuterochloroform; innerer Standart Tetramethyl-silan (TMS).

Oben : Aus dem Urin isolierte Reinsubstanz.
Mitte : Die gleiche Substanz am Pyridin-N methyliert.
Unten : Synthetische N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon.

Die Auswertung des Spektrums bestätigte zwar das Vorliegen einer $-COCH_3$-Gruppe (τ = 7.54, 3 Protonen) und dreier weiterer Protonen bei den τ -Werten 2.31 (2 Protonen) und 3.67 (1 Proton). Die Beurteilung wurde aber erschwert durch das der =N-H - Gruppe zuzuordnende Signal bei τ = 6.54, das nach der elektrischen Integration nur 1/2 Proton entsprach. Es muß daher während der Aufnahme des Spektrums ein Austausch zwischen den Protonen der =N-H - Gruppe und denen des als Lösungsmittel verwendeten Deuterochloroforms stattgefunden haben. Das Kernresonanzspektrum sprach sehr für das Vorliegen von 3-Acetyl-6-pyridon. Da aber auch hier kein Vergleichsspektrum vorlag, mußte noch nach weiteren Beweisen gesucht werden.

Einen Hinweis für die vermutete Struktur erbrachte der Vergleich der UV-Spektren der isolierten Substanz mit dem 6-Methyl-3-nitril-2-pyridon (Abb. 8) (Präparat von Dr. Winterfeld, Organ.Chem.Inst. d. Technischen Universität, Berlin). Diese Substanz ist ein

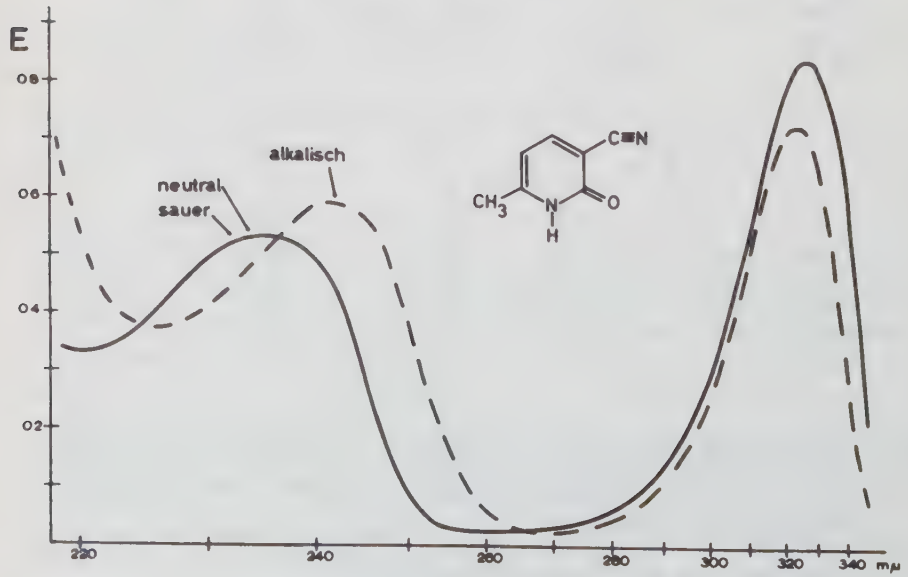

Abb. 8: UV-Spektrum von 6-Methyl-3-Nitril - 2-Pyridon.

2-Pyridon und hat ein völlig anderes chromophores System als ein 6-Pyridon. Im UV-Spektrum finden sich dementsprechend zwei weit auseinander liegende Maxima bei 235 mμ und 325 mμ. Es war also äußerst unwahrscheinlich, daß die isolierte radioaktive Verbindung ein 2-Pyridon sein könnte, vielmehr sprach alles für ein 6-Pyridon.

Die endgültige Klärung der Struktur gelang durch den Vergleich von synthetisch hergestelltem N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon mit dem N-methylierten Naturprodukt.

Zur Synthese von N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon wurde zunächst 3-Acetylpyridin in alkoholischer Lösung mit überschüssigem Methyljodid bei 35° inkubiert. Die schon nach 20 Minuten ausfallenden Kristalle wurden nach Abdunsten des restlichen Methyljodid aus wässriger Lösung mit Alkohol umkristallisiert. Das synthetisierte N-Methyl-3-acetylpyridin wurde anschließend in wässrig-alkalischer Lösung mit überschüssigem Kaliumferricyanid für 5 Stunden bei 80 Grad inkubiert. Das dabei entstandene N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon wurde aus dem Reaktionsgemisch mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, papierchromatographisch gereinigt und durch Vakuumsublimation analysenrein erhalten. Das UV-Spektrum der synthetischen Substanz hat nur ein Maximum bei 275 mμ (Abb. 9), das wegen der Methyladdition am Stickstoff des Pyridinringes auch bei alkalischem pH unverändert bleibt.

Ein Teil der aus dem Urin isolierten Verbindung wurde in wässrig-alkoholischer Lösung bei alkalischem pH mit überschüssigem Methyljodid bei 35°C inkubiert, anschließend papierchromatographiert und vakuumsublimiert. Das UV-Spektrum der jetzt vorliegenden radioaktiven N-Methyl-Verbindung war mit dem der synthetischen Substanz identisch. Ebenso hatten beide Substanzen nach Reaktion mit Methyläthylketon (HERKEN und NEUHOFF, 1963) identische Fluoreszenzspektren (Abb. 10). Auch die Infrarotspektren beider Verbindungen (Abb. 11 und 12) ergaben die gleiche vollkommene Übereinstimmung.

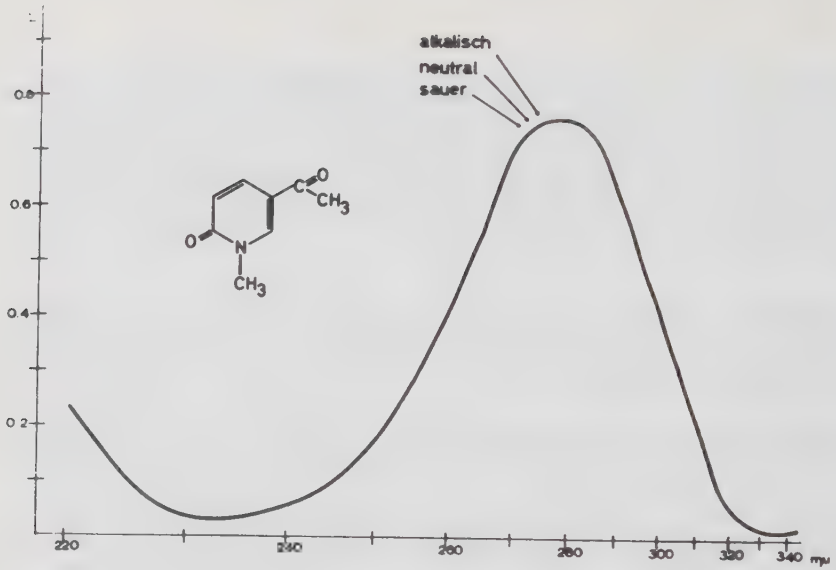

Abb. 9: UV-Spektrum von synthetischem N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon.

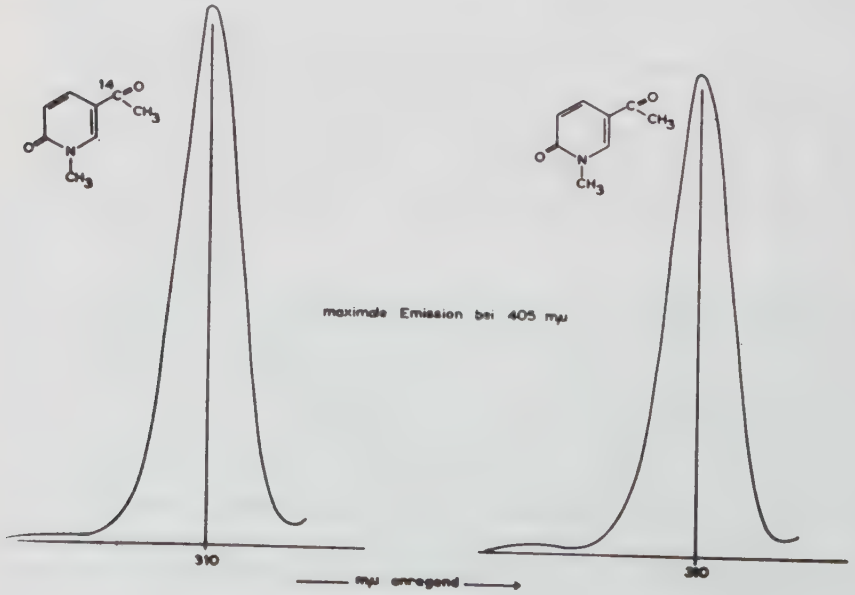

Abb. 10: Anregungsspektren von synthetischem und natürlichem N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon nach Reaktion mit Methyl-äthylketon.

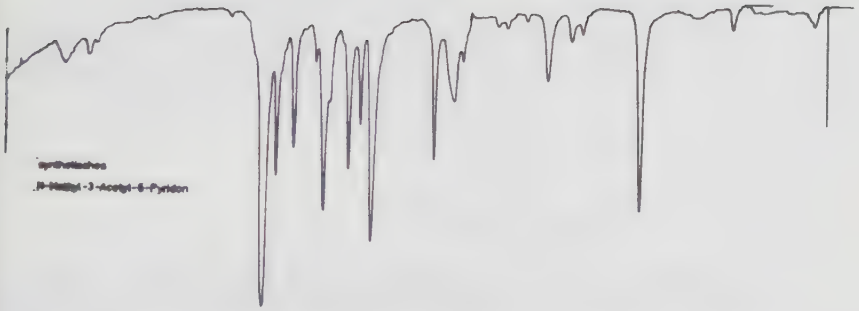

Abb. 11: Infrarotspektrum von N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon.

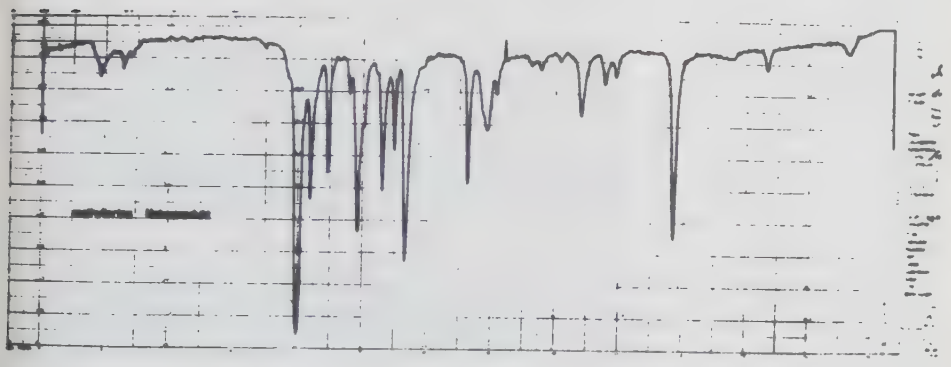

Abb. 12: Infrarotspektrum von ^{14}C-N-Methyl-3-Acetyl-6-Pyridon.

Die Kernresonanzspektren des synthetischen N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon und der radioaktiven, N-methylierten Verbindung aus dem Urin waren in ausgezeichneter Übereinstimmung (Abb. 7, Mitte und unten). Dadurch ist einwandfrei bewiesen, daß es sich bei dem radioaktiven Metaboliten des 3-Acetylpyridins um 3-Acetyl-6-pyridon handelt.

Bei der Serien-Papierchromatographie der radioaktiven Fraktion aus dem Säulendurchlauf wurde noch eine Komponente isoliert, die nur 0,3 % der Gesamtaktivität des Urins repräsentierte. Diese Substanz hatte das gleiche UV-Spektrum wie das synthetisch hergestellte N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon und hatte außerdem bei

der Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Lösungsmittelsystemen den gleichen R_f-Wert. Auf Grund dieser Identität ist nachgewiesen, daß es sich bei dieser aus dem Urin isolierten zweiten radioaktiven Verbindung um N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon handelt.

II.) 3-Acetyl-6-pyridon im Organismus

Die Reinigung und Anreicherung weiterer Metaboliten aus den am Kationenaustauscher haften gebliebenen Fraktionen gestaltete sich erheblich schwieriger als die Isolierung des 3-Acetyl-6-pyridon. Deshalb wurde auf die Isolierung weiterer Metaboliten vorerst verzichtet.

Da 3-Acetyl-6-pyridon als Metabolit des 3-Acetylpyridins bisher nicht bekannt war, und diese Verbindung mit ihrem hohen Anteil an der im Urin ausgeschiedenen Gesamtaktivität nach Gabe von ^{14}C - 3-AP sicher ein Hauptstoffwechselprodukt darstellt, haben wir untersucht, ob sie auch in den Rattenorganen nachweisbar ist. Gleichzeitig sollten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, in welchem Zeitraum nach der Gabe von 3-AP das Pyridon gebildet wird. Dabei sollte außerdem überprüft werden, ob der hohe Anteil von 25 % an der mit dem Urin ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität auch mit einer anderen Methode bestätigt werden konnte. Durch orientierende in vitro-Versuche wollten wir darüber hinaus feststellen, in welcher Fraktion einer Zelle das 3-Acetyl-6-pyridon gebildet wird und ob die Oxydation von 3-AP zum 6-Pyridon durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Luminal oder durch zweimalige Behandlung mit 3-AP zu beeinflussen ist.

A. Methode

1) Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 3-Acetyl-6-pyridon

Nachdem 3-Acetyl-6-pyridon als Reinsubstanz vorlag, ergab die Überprüfung der bei der Isolierung angewandten chromatographischen Methoden, daß sich die Verbindung bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G und Entwickeln mit Benzol : Methanol : Aceton : Eisessig (70 : 20 : 5 : 5) sehr scharf von allen übrigen im Urin enthaltenen Metaboliten abtrennen ließ.

Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 13, die ein Autoradiogramm nach dünnschichtchromatographischer Fraktionierung von 200 µl radioaktiven Urins wiedergibt. Die schwarzen Banden entsprechen radioaktiven Metaboliten, die zweite Fraktion von oben entspricht dem 3-Acetyl-6-pyridon.

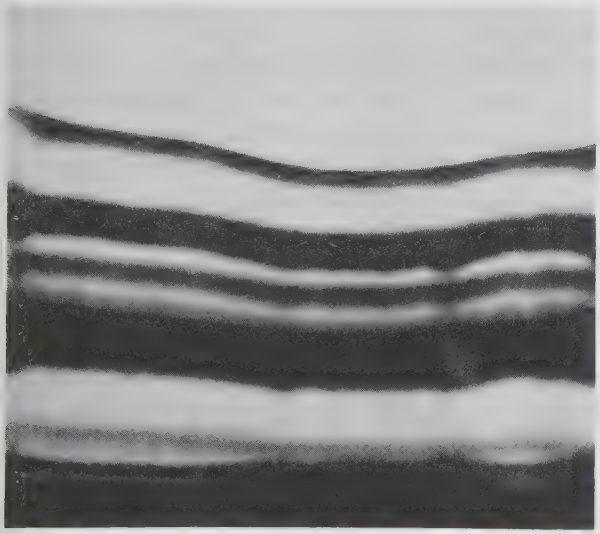

Abb. 13: Autoradiogramm nach Dünnschichtchromatographie von 200 µl Urin.
Schicht : Kieselgel G.
Lösungsmittel: Benzol, Methanol, Aceton, Eisessig.
Exposition : 13 Tage.

In Hinsicht auf die Trennung war die Dünnschichtchromatographie allen anderen chromatographischen Verfahren weit überlegen. Bei der Papierchromatographie in zahlreichen verschiedenen Lösungsmitteln wurde keine gleich gute Trennung erreicht. Ein weiterer

Vorteil der Dünnschichtchromatographie ist, daß für eine Fraktionierung höchstens eine Stunde, für eine Papierchromatographie aber mindestens 8 - 12 Stunden benötigt werden. Ein wesentlicher Nachteil der Dünnschichtchromatographie liegt in der Schwierigkeit, die getrennten Substanzen so sauber aus dem Kieselgel zu gewinnen, daß sie quantitativ bestimmt werden können. Dafür mußte zunächst eine Methode entwickelt werden.

Beim Eluieren von Substanzen aus dem von der Dünnschichtplatte abgeschabten Kieselgel mit Wasser oder Alkohol und anschließendem Filtrieren durch ein ultrahartes Filter, passiert ein Teil des gelösten Kieselgels das Filter. Wenn in den zunächst völlig klaren Filtraten die UV-Absorption gemessen wird, erhält man sehr unterschiedliche Meßwerte, die auf den verschieden hohen Gehalt an gelöstem Kieselgel zurückzuführen sind. Leerwertproben aus noch unbenützten Dünnschichtplatten ergaben bei 275 mμ, dem Extinktionsmaximum von 3-Acetyl-6-pyridon, Extinktionen zwischen 0,05 und 0,2. Das gelöste Kieselgel kann durch Alkalisieren der Lösung als Gel niedergeschlagen und abzentrifugiert werden. Sind in der Lösung Substanzen enthalten, so werden sie dabei jedoch z.T. von dem Gel adsorbiert und mit niedergeschlagen. Aus dem Gel sind sie nur außerordentlich schwer wieder herauszulösen, ohne daß gleichzeitig auch das Kieselgel wieder in Lösung gebracht wird. Eine weitgehend verlustfreie Reinigung ließ sich nur dadurch erzielen, daß die aus dem Kieselgel eluierte Fraktion durch Vakuumdestillation eingeengt wurde und anschließend durch Papierchromatographie in alkalischen Lösungsmitteln vom Kieselgel befreit wurde. Da dieses Vorgehen aber außerordentlich zeitraubend und für Serienuntersuchungen ungeeignet ist, wurde nach einer anderen Lösung gesucht.

Am besten bewährt hat sich das folgende Verfahren: Nach dem Entwickeln der Dünnschichtplatte wird die unter einer UV-Lampe markierte Fraktion mit einem Spatel abgekratzt und das Kieselgel mit enthaltender Substanz direkt in Zentrifugenbechern gesammelt. Anschließend wird ein definiertes Volumen Wasser (10 ml) in die Becher pipettiert, die Becher mit einem Schraubverschluß vakuumdicht abgeschlossen und mehrfach sehr sorgfältig geschüttelt. Dann wurden die Kieselgel-Wasser-Suspensionen in einer Spinco-Ultrazentrifuge für 1 Stunde bei 40 000 UpM (= 105 000 . g)

zentrifugiert. Entscheidend ist danach, die klaren Überstände so aus den Zentrifugenbechern zu gewinnen, daß das sehr leichte Kieselgel nicht wieder aufgewirbelt wird, wofür geringste Erschütterungen des Rotors bereits genügen. Die Lösungen können also nicht wie üblich einfach dekantiert werden. Die Abb. 14 veranschaulicht das von uns angewandte Verfahren. Der Rotor wurde nach dem Auslaufen behutsam aus der Zentrifuge herausge-

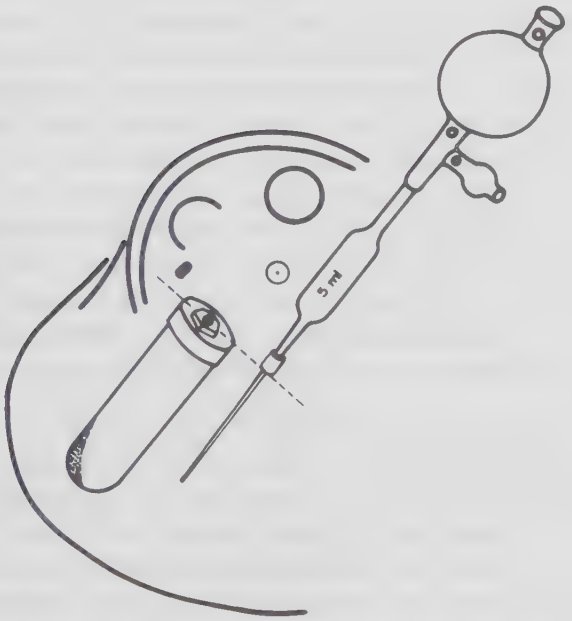

Abb. 14: Verfahren zur Gewinnung kieselgelfreier Fraktionen nach Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten.

nommen und der Rotordeckel vorsichtig abmontiert. Die Schraubverschlüsse der Zentrifugenbecher hatten alle eine kleine zentrale Mittelschraube, die mit einem Vierkantschlüssel gelöst wurde. Durch diese Öffnung wurde eine Kapillare eingeführt, die so an eine 5 ml Pipette befestigt war, daß sie nicht bis auf den Boden der Zentrifugenbecher reichen konnte. Da ca. 3 ml für eine

Extinktionsmessung genügen, wurden mit einem der Pipette aufgesetzten Peleusball vorsichtig 4 - 5 ml vom Überstand aufgesaugt und in Reagenzgläschen pipettiert. 24 Kontrollversuche mit Leerwertproben, die nach diesem Verfahren gewonnen wurden, ergaben bei 275 mμ eine Extinktion von 0,018 ± 0,008.

Zur Kontrolle der quantitativen Extraktion einer wasserlöslichen Substanz aus dem Kieselgel nach erfolgter Fraktionierung wurde Nicotinamid verwandt. Je 50 μl einer konzentrierten Nicotinamidlösung, die in 10 ml verteilt eine Extinktion von 0,65 bei 260 mμ hatten, wurden auf 4 Dünnschichtplatten aufgetragen und chromatographiert. Die unter der UV-Lampe markierten und ausgeschabten Fraktionen wurden in 10 ml H_2O suspendiert, geschüttelt, zentrifugiert und in einem aliquoten Teil des Überstandes die Extinktion bei 260 mμ gemessen. Die Messungen ergaben 0,67, 0,665, 0,67, 0,66, im Mittel also 0,662. Nach Abzug des Leerwertes von 0,018 resultiert eine Extinktion von 0,644. Das entspricht 99 % der auf die Platten aufgebrachten Substanzmenge. Dieses Verfahren erlaubt also die quantitative Bestimmung wasserlöslicher Verbindungen auch nach dünnschichtchromatographischer Fraktionierung.

Zur Bestimmung der spezifischen Extinktion von 3-Acetyl-6-pyridon wurden 1,03 mg der Reinsubstanz in 50 ml H_2O gelöst und die Extinktion bei 275 mμ und neutralem pH sowie bei 312 mμ und alkalischem pH gemessen. Demnach hat 1 μMol 3-Acetyl-6-pyridon bei E_{275} und 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 8,910/ml und bei E_{312} 11,240/ml. Die spezifische Extinktion bei 275 mμ wurde zur Berechnung des aus den Organen extrahierten und dünnschichtchromatographisch isolierten 3-Acetyl-6-pyridons verwandt.

2) Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon aus Organen.

Bei der Ionenaustauschchromatographie von perchlorsauren Hirnextrakten von Ratten, die ^{14}C-3-AP erhalten hatten, konnte NEUHOFF (1964) bereits nachweisen, daß 3-Acetyl-6-pyridon auch im Gehirn vorhanden ist. Zur quantitativen Bestimmung dieser Verbindung mußte zunächst eine Methode gefunden werden, mit der sie auch vollständig aus den zu untersuchenden Organen,

Leber, Niere, Gehirn, Blut und Milz zu gewinnen ist.

Zunächst haben wir versucht, perchlorsaure Extrakte nach dem Neutralisieren mit KOH und Abzentrifugieren des ausgefallenen Kaliumperchlorates mit der bewährten dünnschichtchromatographischen Methode zu fraktionieren. Dabei stellte sich heraus, daß mit diesen Extrakten keine einwandfreie Trennung des 3-Acetyl-6-pyridon von anderen Substanzen zu erreichen war. Daraufhin wurden die Organe mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, in denen 3-Acetyl-6-pyridon gut löslich ist, extrahiert. Verwandt wurden n-Butanol, abs.Äthanol, abs.Methanol und Aceton. Die gewogenen Organe wurden im 10-fachen Volumen des jeweiligen Lösungsmittels mit einem Ultraturrax (23 000 UpM) homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 31 000 . g zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Vakuumdestillation konzentriert und die Konzentrate quantitativ auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Zum Nachspülen der bei der Destillation verwandten 100 ml Rundkolben wurde Äthanol benutzt. Mit allen organischen Extrakten konnten einwandfreie Dünnschichtchromatogramme erhalten werden. Die schärfste Fraktionierung wurde mit alkoholischen Extrakten erreicht.

Zur Überprüfung der Extraktion auf Vollständigkeit wurde die Leber verwandt. 6 Stunden nach der Applikation von 100 mg/kg 3-AP wurden aliquote Mengen einer Leber abgewogen und in den organischen Lösungsmitteln homogenisiert. Die höchste Ausbeute an 3-Acetyl-6-pyridon wurde bei alkoholischer Extraktion erzielt. Werden die Werte nach Alkoholextraktion gleich 100 % gesetzt, konnten mit n-Butanol nur 85 %, mit Methanol 50 % und mit Aceton nur 40 % des im Organ enthaltenen 3-Acetyl-6-pyridons gewonnen werden. Wir haben daher für die Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon aus Organen abs. Äthanol verwandt.

Werden die Organe im 10-fachen Volumen Äthanol homogenisiert, ist bereits bei einmaliger Extraktion alles Pyridon vollständig zu gewinnen. Eine Nachextraktion des abzentrifugierten Rückstandes erübrigt sich dann.

Der Alkoholextrakt von jedem einzelnen Organ wurde auf einer einzigen Dünnschichtplatte aufgetragen. Nur für die Leberextrakte wurden 2 Platten pro Organ benötigt. Außerdem wurden die Kieselgelschichten für die Chromatographie der Leberextrakte dicker (300 µ) als für die übrigen Organe (200 µ) hergestellt. Bei der alkoholischen Extraktion der Leber werden sehr viel Lipoide mit extrahiert, die bei der Dünnschichtchromatographie die Fraktionierung störend beeinflussen. Das konnte dadurch vermieden werden, daß dem Lösungsmittelgemisch 1 - 2 Tropfen Tween 80 zugesetzt wurden. Damit wurde erreicht, daß die Lipoide mit der Lösungsmittelfront wandern und das ebenfalls relativ schnell wandernde 6-Pyridon als scharfe Fraktion auch ohne Verunreinigung durch Lipoide aus der Platte zu gewinnen war.

Für die Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon aus dem Urin wurde der gesammelte Urin durch Vakuumdestillation eingeengt und quantitativ auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Je nach der zu fraktionierenden Urinmenge wurden eine oder mehrere Platten verwandt.

Aus dem Blut wurde 3-Acetyl-6-pyridon in gleicher Weise wie aus den Organen gewonnen. Das Blut wurde nach dem Dekapitieren der Tiere in Bechergläsern aufgefangen, gewogen, mit dem 10-fachen Volumen Äthanol homogenisiert und wie beschrieben fraktioniert.

B. Ergebnisse

1) Verteilung von 3-Acetyl-6-pyridon im Organismus.

Insgesamt 30 Ratten im Gewicht von 160-180 g erhielten 80 mg/kg 3-AP intraperitoneal appliziert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation (1, 2, 4, 6 und 8 Stunden) wurden die Tiere dekapitiert, die Organe entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. In allen untersuchten Organen, Blut, Leber, Niere, Gehirn, Milz, wurde 3-Acetyl-6-pyridon gefunden.

In Tab. 1 sind die einzelnen Meßwerte aufgeführt. In Abb. 15 sind die Mittelwerte dieser Versuchsserie zusammengefaßt.

Tabelle 1:

Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon nach Gabe von 80 mg/kg 3-Acetyl-pyridin (Werte in µMol/g; ± = mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Organ	1.Std	2.Std	4.Std	6.Std	8.Std
Blut	0,0838	0,1240	0,1459	0,1077	0,0733
	0,1105	0,1102	0,1801	0,1048	0,0437
	0,0928	0,1251	0,1578	0,1111	0,0383
	0,0814	0,1113	0,1725	0,1085	0,0655
	0,0704	0,1022	0,1458	0,1259	0,0525
	0,0878	0,1146	0,1575	0,1127	0,0540
	E±0,007	±0,004	±0,006	±0,003	±0,005
Leber	0,0651	0,0908	0,0850	0,0900	0,0569
	0,0811	0,1067	0,0819	0,0868	0,0597
	0,0632	0,1026	0,0945	0,0793	0,0576
	0,0850	0,0772	0,1025	0,0722	0,0627
	0,0609	0,0789	0,0991	0,0607	0,0614
		0,0717	0,1081		
	0,07106	0,08798	0,0952	0,0778	0,05966
	E±0,005	±0,006	±0,004	±0,005	±0,001
Niere	0,1589	0,2159	0,2525	0,2338	0,1437
	0,1603	0,1855	0,2565	0,1982	0,1283
	0,1641	0,2003	0,2334	0,1684	0,0868
	0,1424	0,1356	0,2719	0,1814	0,1122
	0,1356	0,1731	0,2538	0,2245	0,1167
	0,1310				
	0,1487	0,1821	0,2536	0,20126	0,1175
	E±0,006	±0,014	±0,006	±0,012	±0,009
Gehirn	0,0578	0,0878	0,0952	0,0912	0,0525
	0,0792	0,0793	0,1089	0,0772	0,0281
	0,0544	0,0859	0,1403	0,0842	0,0238
	0,0409	0,0561	0,0912	0,0918	0,0204
	0,0594	0,0561	0,0987	0,0760	0,0544
			0,0947	0,0736	0,0264
	0,0583	0,07304	0,1048	0,0823	0,03427
	E±0,006	±0,007	±0,008	±0,003	±0,006

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Organ	1.Std	2.Std	4.Std	6.Std	8.Std
Milz	0,1047	0,1377	0,1276	0,1684	0,0724
	0,1122	0,1055	0,1282	0,1581	0,0842
	0,1083	0,1478	0,1735	0,1403	0,0892
	0,1046	0,0935	0,1785	0,1212	0,0898
	0,1203	0,0979	0,1651	0,1512	0,0749
				0,1182	
	0,1100	0,1165	0,1546	0,1430	0,0821
	±0,003	±0,011	±0,011	±0,008	±0,004

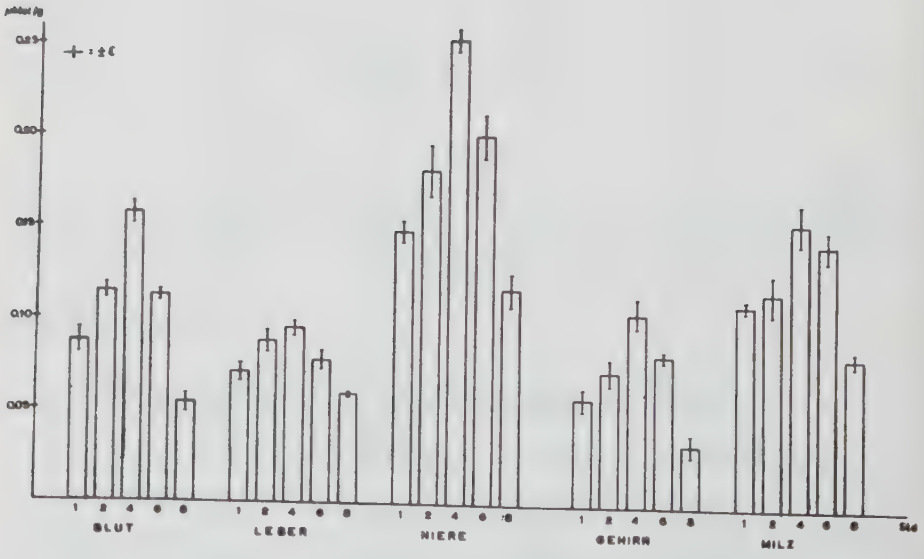

Abb. 15: Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon in verschiedenen Organen.

In den Organen ist bereits 1 Stunde nach der Gabe von 3-AP 6-Pyridon nachzuweisen. Das Maximum der Bildung ist bereits in der 4. Stunde erreicht. 8 Stunden nach der Vergiftung ist nur noch wenig 6-Pyridon vorhanden. Nach 12 Stunden ist mit der von uns verwandten Bestimmungsmethode kein 6-Pyridon mehr nachweisbar. Mit Abstand der höchste Gehalt an 6-Pyridon ist mit 0,2536 µMol/g Frischgewicht in der Niere 4 Stunden nach der Vergiftung festzustellen. An zweiter Stelle folgen Blut und Milz, die mit 0,1575 µMol bzw. 0,1546 µMol praktisch die gleiche Menge an 6-Pyridon enthalten. In Leber und Gehirn sind die Werte mit 0,0952 bzw. 0,1048 µMol/g deutlich niedriger als in den übrigen Organen.

2. Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon mit dem Urin.

Für diese Untersuchung erhielten 6 Ratten je 80 mg/kg 3-AP und wurden so in Käfige gesetzt, daß der Urin vollständig in Mensuren aufgefangen werden konnte. In Abständen von 2 Stunden wurde der bis dahin ausgeschiedene Urin abgenommen und gesondert untersucht. Die Analysenergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Bereits in den ersten zwei Stunden werden 5,48 µMol 3-Acetyl-6-pyridon ausgeschieden, das sind 5,2 % des applizierten 3-Acetylpyridins. Das Maximum der Ausscheidung liegt mit 8,16 µMol zwischen der 2. und 4. Stunde. Zwischen der 6. und 8. Stunde wird mit 5,19 µMol die gleiche Menge wie in den ersten beiden Stunden ausgeschieden. Bei zwei Tieren haben wir auch noch den Urin bis zu 24 Stunden nach der Injektion gesammelt und analysiert. Zwischen der 8. und 24. Stunde wird nur mehr die minimale Menge von 0,8 µMol sezerniert. Insgesamt werden innerhalb 8 Stunden 25,0 µMol und in 24 Stunden 25,79 µMol 3-Acetyl-6-pyridon mit dem Urin ausgeschieden. Die Versuchstiere erhielten im Mittel 105 µMol 3-AP injiziert, von denen insgesamt 24 % als 6-Pyridon im Sammelurin gefunden wurden. Dieser Wert entspricht sehr gut den 25 % ^{14}C-3-Acetyl-6-pyridon, die wir nach Gabe von 100 mg/kg ^{14}C-3-AP aus dem Urin isolieren konnten.

Tabelle 2:

Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon mit dem Urin.
(Werte in µMol; ± = mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Nach Gabe von 80 mg/kg 3-Acetylpyridin

0-2.Std	2-4.Std	4-6.Std	6-8.Std	0-8.Std
5,1852	8,0808	6,5657	3,7710	23,6027
5,2525	8,2604	5,2525	4,5791	23,3445
4,7138	6,9360	10,9428	5,6566	28,2492
5,2862	7,6319	5,5892	4,5455	23,0528
8,3479	5,6902	5,9259	4,1751	24,1391
4,0741	12,3457	2,8283	8,4175	27,6656
5,4766	8,1575	6,1841	5,1908	25,0090
±0,605	±0,920	±1,057	±0,694	±0,947

3. Bildung von 3-Acetyl-6-pyridon nach wiederholter Gabe von 3-Acetylpyridin.

Bei Untersuchungen über die Bildung 3-Acetylpyridin enthaltender Pyridinnucleotide im ZNS hatte NEUHOFF (1964) festgestellt, daß nach zweimaliger Gabe von 3-AP im Abstand von 24 Stunden wesentlich weniger freies 3-AP im Gehirn nachweisbar ist, als nach einmaliger Injektion von 3-AP. Dieser Befund hat uns veranlaßt, bei der gleichen Versuchsanordnung die Bildung und Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon zu untersuchen. Bei der ersten Injektion erhielten die Versuchstiere 60 mg/kg und nach 24 Stunden 80 mg/kg 3-AP. In Abständen von 1, 2, 4 und 6 Stunden nach der zweiten Injektion wurden die Tiere getötet, das Blut aufgefangen, Leber, Niere und Gehirn entnommen und wie beschrieben analysiert. Die Einzelergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt. In Abb. 16 sind die Mittelwerte dargestellt. Vergleicht man diese Werte mit denen, die nach einmaliger Gabe von 3-AP gefunden wurden, so fällt auf, daß in allen Organen weniger 6-Pyridon gefunden wurde. Nach der wiederholten Gabe von 3-AP waren 8 Stunden nach Versuchsbeginn nur so minimale Mengen an 6-Pyridon in den Organen nachzuweisen, daß sie mit unserer Methode kaum erfaßt werden konnten.

Tabelle 3:

Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon nach wiederholter Gabe von 3-Acetylpyridin; 1 x 60 mg/kg und 1 x 80 mg/kg 3-Acetylpyridin im Abstand von 24 Stunden. (Werte in µMol/g; ± = mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Organ	1.Std	2.Std.	4.Std	6.Std
Blut	0,0847	0,1103	0,1033	0,0957
	0,0952	0,1081	0,1015	0,0738
	0,0901	0,0773	0,1305	0,0909
			0,1068	0,0923
	0,0900	0,0986	0,1105	0,0882
	±0,003	±0,011	±0,007	±0,005
Leber	0,0475	0,0915	0,0818	0,0737
	0,0886	0,0937	0,0863	0,0618
	0,0844	0,0760	0,0933	0,0717
	0,0957	0,0927	0,0817	0,0623
	0,0791	0,0885	0,0858	0,0674
	±0,012	±0,004	±0,002	±0,003
Niere	0,0978	0,1886	0,2110	0,1684
	0,1310	0,1874	0,2512	0,1450
	0,1079	0,1560	0,2469	0,1855
	0,1324	0,1777	0,2150	0,1731
	0,1173	0,1774	0,2310	0,1680
	±0,008	±0,008	±0,011	±0,008
Gehirn	0,0609	0,0834	0,0942	0,0673
	0,0596	0,0724	0,0738	0,0513
	0,0714	0,0770	0,0811	0,0654
				0,0561
	0,0640	0,0776	0,0830	0,0600
	±0,004	±0,003	±0,006	±0,004

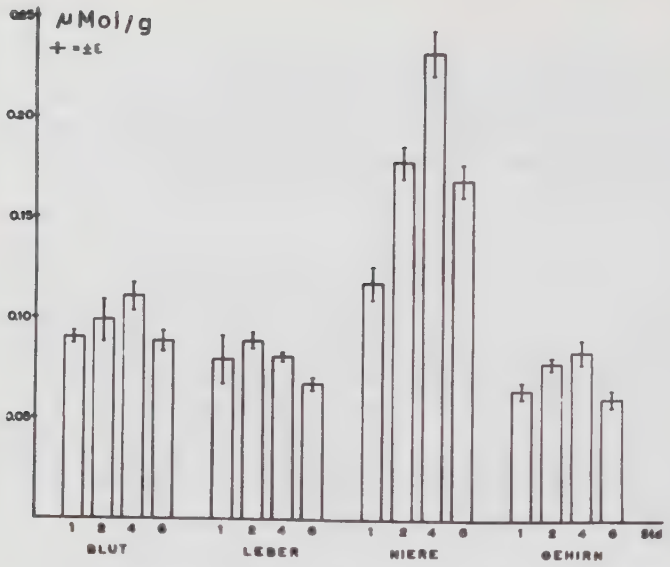

Abb. 16: Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon nach wiederholter Gabe von 3-Acetylpyridin.

Wird die in der gesamten Versuchsdauer gefundene 6-Pyridonmenge summiert, so finden sich im Blut 26,5 %, in der Leber 18,1 %, in der Niere 23,2 % und im Gehirn 19,3 % weniger als nach einmaliger Injektion von 3-AP. Dem entspricht, daß auch mit dem Urin 26,5 % weniger 3-Acetyl-6-pyridon ausgeschieden wird als nach einmaliger Behandlung (Tab. 5 und Abb. 18).

4. Bildung und Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon nach Vorbehandlung mit Luminal.

Durch die Untersuchungen von REMMER u.a. (1961, 1962, 1963, 1964) ist bekannt, daß nach mehrfacher Gabe von Luminal die microsomalen Strukturen und oxydierende microsomale Enzyme in der Leber vermehrt werden. Bei der 3-AP-Vergiftung führte die Vorbehandlung mit Luminal zu einer erhöhten Bildung abnorm strukturierter Pyridinnucleotide im ZNS und zur beschleunigten Elimination von 3-AP aus dem Gehirn (NEUHOFF, 1964). Wir wollten daher prüfen, wie sich 3-Acetyl-6-pyridon unter vergleichbaren Versuchsbedingungen verhält.

Die Versuchstiere erhielten in Abständen von 24 Stunden 3 x je 70 mg/kg Luminal i.p. und 24 Stunden nach der letzten Luminalgabe 80 mg/kg 3-AP. Die Organe und der Urin wurden wie beschrieben aufgearbeitet. Die Analysenergebnisse sind in Tab. 4, die Mittelwerte in Abb. 17 zusammengefaßt.

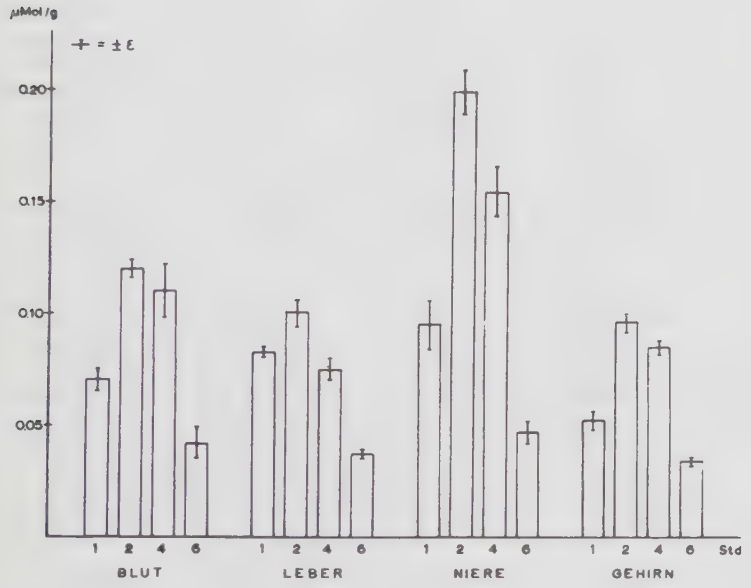

Abb. 17: Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon nach Vorbehandlung mit Luminal.

Bei dem Vergleich mit den Werten, die nach Gabe von 3-AP allein erhalten wurden, fällt zunächst auf, daß das Maximum der Pyridon-Bildung auf die 2. Stunde nach der Injektion vorverlegt ist. Außerdem wird erheblich weniger an 6-Pyridon gebildet und ausgeschieden. In der Gesamtsumme wurden im Blut 35,1 %, in der Leber 24,7 %, in der Niere 45,1 % und im Gehirn 22,7 % weniger 6-Pyridon gefunden als nach der einzelnen 3-AP-Injektion. Im Urin wurden nur 40,6 % der Menge an 3-Acetyl-6-pyridon gefunden, die nach der einmaligen Gabe von 80 mg/kg 3-AP nachweisbar sind (Tab. 5 und Abb. 18).

Tabelle 4:

Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon nach Vorbehandlung mit Luminal 3 x 70 mg/kg Luminal und 1 x 80 mg/kg 3-Acetylpyridin in Abständen von 24 Stunden.

(Werte in µMol/g; ± = mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Organ	' 1.Std	' 2.Std	' 4.Std	' 6.Std
Blut	0,0632	0,1247	0,1457	0,0320
	0,0722	0,1168	0,1036	0,0561
	0,0621	0,1102	0,0943	0,0375
	0,0835	0,1275	0,0964	
	0,0703	0,1198	0,1100	0,0419
	±0,005	±0,004	±0,012	±0,007
Leber	0,0786	0,1058	0,0890	0,0334
	0,0868	0,0915	0,0701	0,0391
	0,0802	0,0907	0,0678	0,0385
	0,0845	0,1144	0,0723	
	0,0825	0,1006	0,0748	0,0370
	±0,002	±0,006	±0,005	±0,002
Niere	0,0855	0,2009	0,1355	0,0561
	0,0935	0,1964	0,1571	0,0421
	0,0749	0,1758	0,1684	0,0428
	0,1268	0,2245	0,1854	
			0,1268	
	0,09518	0,1994	0,1546	0,0470
	±0,011	±0,010	±0,011	±0,005
Gehirn	0,0510	0,1091	0,0884	0,0340
	0,0612	0,0892	0,0918	0,0315
	0,0421	0,0942	0,0782	0,0374
	0,0561	0,0947	0,0825	
	0,0526	0,0968	0,0852	0,0343
	±0,004	±0,004	±0,003	±0,002

Tabelle 5:

Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon mit dem Urin.
(Werte in µMol; ± = mittlerer Fehler des Mittelwertes)

0-2.Std	2-4.Std	4-6.Std	6-8.Std	0-8.Std
Nach wiederholter Gabe von 3-Acetylpyridin				
4,2424	6,3973	2,6936	6,0606	19,3939
2,9293	1,6835	5,2189	3,0303	12,8620
4,1751	9,0909	6,3300	3,4343	23,0303
5,7912	0,3928	7,4074	4,6464	18,2378
4,2845	4,3911	5,4125	4,2929	18,3810
±0,586	±2,0296	±1,0104	±0,682	±2,104
Nach Vorbehandlung mit Luminal				
3,8608	5,2525	2,9630	1,0382	13,1145
2,5140	4,5791	1,7957	1,0213	9,9101
2,8283	3,9731	1,0943	0,5836	8,4793
4,9383	2,8283	0,8418	0,4602	9,0686
3,5354	4,1583	1,6737	0,7758	10,1431
±0,549	±0,515	±0,313	±0,149	±1,033

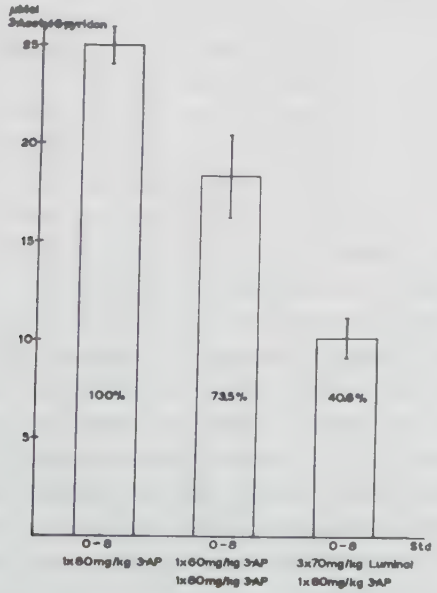

Abb. 18: Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon im Urin.

5. In vitro Synthese von 3-Acetyl-6-pyridon in isolierten Zellfraktionen.

In orientierenden in vitro-Versuchen haben wir festgestellt, in welcher Zellfraktion das 6-Pyridon gebildet wird.

Die Leber von unbehandelten Kontrolltieren wurde in 0,25 M Saccharose-Lösung (1 Teil Leber : 5 Teile Saccharoselösung) mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator in der Kälte homogenisiert. 3-AP wurde in einer 0,1 %igen Glucose-Krebs-Ringer-Lösung dem Homogenat zugefügt, so daß eine Endkonzentration von 10^{-2}M 3-AP vorlag. Das Homogenat wurde dann für 1 Stunde bei 37°C unter Luftzutritt geschüttelt. Danach wurde das 10-fache Volumen abs.Äthanol zugesetzt und der nach dem Zentrifugieren erhaltene Extrakt wie beschrieben aufgearbeitet. Im Dünnschichtchromatogramm konnte reichlich 3-Acetyl-6-pyridon nachgewiesen werden. Daraufhin wurden aus einem Leberhomogenat durch fraktionierte Zentrifugation die einzelnen Zellbestandteile isoliert.

Durch 10 Min. Zentrifugation bei 800 . g wurden die Zellkerne sedimentiert und durch dreimaliges Waschen mit 0,25 M Saccharoselösung gereinigt. Der Überstand wurde anschließend 10 Minuten bei 9000 . g zentrifugiert und die dabei gewonnenen Mitochondrien ebenfalls dreimal gewaschen. Aus diesem Überstand wurden die Mikrosomen in einer Spinco-Ultrazentrifuge 120 Min. bei 105 000 . g vom Hyaloplasma abzentrifugiert. Die Mikrosomen wurden ebenso wie die vorherigen Zellfraktionen in 0,25 M Saccharose suspendiert. Jeder der isolierten Fraktionen, Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma, wurde 3-AP bis zur Endkonzentration von 10^{-2}M zugesetzt. Nach dem Inkubieren bei 37° für 1 Stunde wurden Alkoholextrakte hergestellt und analysiert. In der Kern- und Mitochondrienfraktion war kein 6-Pyridon nachzuweisen. In der Mikrosomenfraktion fanden sich Spuren an 6-Pyridon, die aber auf Verunreinigung durch Hyaloplasma zurückzuführen sind. Die Hauptmenge an 2-Acetyl-6-pyridon fand sich eindeutig im Cytoplasma. Die Oxydation vom 3-Acetylpyridin zum 3-Acetyl-6-pyridon erfolgt demnach ausschließlich im Cytoplasma der Zellen.

Diskussion

3-Acetylpyridin unterliegt einem außerordentlich lebhaften Stoffwechsel, wenn es Ratten appliziert wird. Es entstehen mindestens 12 verschiedene Produkte. Diese Verbindung wird so vollständig umgesetzt, daß kein unverändertes 3-AP im Urin der Versuchstiere nachweisbar ist (BEHER et al. 1959). Nicht einmal nach der sehr hohen Dosis von 1000 mg/kg i.p. wird unverändertes 3-AP im Urin gefunden. Auffallend ist weiterhin, daß auch kein N-Methyl-3-Acetylpyridin im Urin gefunden wurde (NEUHOFF und HARRIS, 1964). Demgegenüber wird nach der Gabe von Nicotinamid sowohl unverändertes Nicotinamid, als auch vermehrt N-Methylnicotinamid ausgeschieden (PERLZWEIG u.a. 1949/50, LEIFER, ROTH u.a. 1951, LINDENBLAD u.a. 1955, Wu CHANG u. JOHNSON, 1957).

Als ein Hauptmetabolit des 3-AP konnte 3-Acetyl-6-pyridon isoliert und identifiziert werden. 25 % des applizierten 3-AP wird als 6-Pyridon ausgeschieden. Außerdem wurde noch N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon isoliert, das jedoch mit nur 0,3 % einem minimalen Teil des injizierten 3-AP entspricht. Auch N-Methyl-3-carboxamid-6-pyridon ist als ein Metabolit des Nicotinamid beschrieben (LEIFER, ROTH u.a. 1951). Diese Verbindung stimmt mit ihrem Substituenten dem von uns gefundenen N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon, überein. Da diese Substanz aber nur zu einem sehr geringen Anteil gebildet wird, ist nicht anzunehmen, daß die N-Methylierung und Oxydation in Stellung 6 des Pyridinringes einen wesentlichen Abbauweg des 3-AP darstellt. Ein 6-Pyridon des Nicotinamid, also eine dem 3-Acetyl-6-pyridon vergleichbare Verbindung, ist bisher noch nicht als Metabolit des Nicotinamid beschrieben worden. Im Stoffwechsel dieser beiden chemisch so außerordentlich ähnlichen Verbindungen bestehen also erhebliche Unterschiede. Die völlig fehlende Ausscheidung von N-Methyl-3-acetylpyridin und die reichliche Bildung von 3-Acetyl-6-pyridon läßt es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß durch 3-AP Methylierungsreaktionen in der Leber gestört werden könnten.

3-Acetyl-6-pyridon konnte im Blut, in Leber, Niere, Gehirn und in der Milz nachgewiesen und seine Bildung quantitativ verfolgt werden. Bereits 1 Stunde nach der Applikation von 3-AP ist in allen untersuchten Organen das 6-Pyridon nachweisbar. Das Maximum der Bildung liegt in der 4. Stunde. 10 Stunden nach der Applikation werden nur mehr minimale Mengen gebildet und ausgeschieden.

Die für die Oxydation des 3-AP zum 6-Pyridon verantwortlichen Enzyme sind im Cytoplasma der Zellen lokalisiert. Wie in vitro Inkubationsversuche mit isolierten Zellfraktionen ergaben, wird das 6-Pyridon nur im Cytoplasma gebildet. Sehr wahrscheinlich ist die ebenfalls im Cytoplasma vorkommende Aldehyd-Oxydase (RAJAGOPALAN et al. 1962) das oxydierende Enzym. KNOX (1946) hat nachgewiesen, daß das Enzym direkt mit Sauerstoff reagieren kann und das von den physiologisch vorkommenden Verbindungen N-Methyl-nicotinamid am schnellsten oxydiert wird. N-Methyl-nicotinamid wird dabei zum 6-Pyridon oxydiert (KNOX und GROSSMANN, 1948).

Überraschend war zunächst der Befund, daß nach wiederholter Injektion von 3-AP ebenso wie nach einer Luminalbehandlung nach dem von REMMER (1961) angegebenen Schema und anschließender 3-AP-Gabe, erheblich weniger 6-Pyridon gebildet wurde. Nach 3-AP-Vorbehandlung wurden nur 73,5 % und nach Luminalvorbehandlung nur mehr 40,6 % der Menge an 6-Pyridon mit dem Urin ausgeschieden, die nach einmaliger Applikation von 3-AP gefunden wurden. Eine erste Erklärung für diese Beobachtung ist darin zu sehen, daß nach den Untersuchungen von REMMER u.a. (1961, 1963, 1964) durch die Luminalgabe in erster Linie die in den Mikrosomen lokalisierten Enzyme induziert werden und dementsprechend nur der Stoffwechsel von den Verbindungen beschleunigt wird, die in den Mikrosomen umgesetzt werden. Da auch durch zahlreiche und chemisch sehr verschiedene Verbindungen diese Enzyminduktionen ausgelöst werden können (REMMER, 1962; CONNEY et al. 1956, 1960, 1963; KATO, 1960; MILLER et al. 1958), ist anzunehmen, daß die im Prinzip gleichartigen Veränderungen in der 6-Pyridonbildung nach wiederholter Applikation von 3-AP, wie nach Luminalbehandlung, auf dem gleichen Mechanismus beruhen. Daß nach diesen Vorbehandlungen keine

vermehrte Pyridonbildung zu beobachten war, kann also darauf zurückgeführt werden, daß 3-AP nicht in den Mikrosomen, sondern im Cytoplasma zum 6-Pyridon oxydiert wird. Die beobachtete stark verminderte Bildung und Ausscheidung von 6-Pyridon muß dann darauf beruhen, daß ein in den Mikrosomen lokalisierter Stoffwechselschritt des 3-AP durch Luminal bzw. 3-AP-Vorbehandlung so stark stimuliert wird, daß andere Metaboliten vermehrt gebildet werden können und deshalb weniger 6-Pyridon entsteht.

NEUHOFF und KOHLER (1965) haben als einen weiteren Hauptmetaboliten des 3-AP, der ca. 40 % des applizierten 3-AP repräsentiert, das Pyridin-3-methyl-carbinol-glucuronid aus dem Urin isolieren und identifizieren können. Pyridin-3-methyl-carbinol wurde von Mc KENNIS (1964) als Metabolit des 3-AP beschrieben. KANIG, KORANSKY u.a. (1964) haben es im ZNS der Versuchstiere nachgewiesen. NEUHOFF und KÖHLER (1965) konnten 5 % des applizierten 3-AP als Carbinol im Urin wiederfinden. Im Pyridin-3-methyl-carbinol ist die Ketogruppe der 3-Acetylseitenkette des Pyridins zur alkoholischen -OH Gruppe reduziert.

Die Glucuronyltransferase, ein Enzym, das die Übertragung der Glucuronsäure von der Uridin-diphosphat-glucuronsäure auf phenolische oder alkoholische -OH Gruppen katalysiert, ist nach ISSELBACHER und AXELROD (1955) in den Mikrosomen lokalisiert. Nach Untersuchungen von BURNS et al. (1957) wird nach Gabe von Diätylbarbitursäure (Barbital) die Ausscheidung von Glucuronsäure im Urin auf mehr als das Doppelte erhöht. Da Barbital weder metabolisiert noch glucuronidiert werden kann (BURNS et al. 1957), ist die erhöhte Ausscheidung von Glucuronsäure nach Barbitalbehandlung sicher auf eine vermehrte Synthese von Glucuronsäure als Folge einer Enzyminduktion zurückzuführen. Dafür spricht auch, daß bei gleichzeitigem Angebot von 1-^{14}C-Glucose und Barbitalbehandlung wesentlich mehr ^{14}C-Glucuronsäure gefunden wurde als nach Gabe von ^{14}C-Glucose allein.

Wenn also die Behandlung mit Barbituraten zu einer stark erhöhten Glucuronsäuresynthese führt, erscheint es nicht ausgeschlossen, daß auch die Glucuronyltransferase durch Enzyminduktion vermehrt oder zumindest aktiviert wird. Dafür spricht

auch der Befund von REMMER (1964), daß Sulfadimethoxin nach Luminalbehandlung verstärkt glucuronidiert wird.

MAGOUR (1965) konnte nachweisen, daß nach wiederholter Applikation von Luminal auch reduzierende Mikrosomenenzyme eine Aktivitätssteigerung erfahren.

Es ist daher als sehr wahrscheinlich anzunehmen, daß die beobachtete Verminderung der 6-Pyridonbildung nach wiederholter 3-Acetylpyridin- bzw. Luminalbehandlung darauf zurückzuführen ist, daß 3-AP vermehrt zum Pyridin-3-methyl-carbinol reduziert und als Glucuronid ausgeschieden wird.

Ob 3-Acetyl-6-pyridon auch noch eine eigene Wirkung beim Zustandekommen des vorwiegend zentralnervösen Vergiftungsbildes der 3-Acetylpyridinvergiftung hat, kann erst untersucht werden, wenn ausreichende Mengen dieser Verbindung für die erforderlichen in vivo und in vitro Versuche zur Verfügung stehen. Weil der Stickstoff des 6-Pyridons noch additionsfähig ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch diese Substanz gegen das Nicotinamid in den Pyridinnucleotiden ausgetauscht werden kann. Da im Verlauf der Vergiftung 25 % des applizierten 3-AP zum 6-Pyridon oxydiert werden, könnte die Bildung 6-Pyridon enthaltender Pyridinnucleotide schon einen nennenswerten Umfang erreichen. Mit den relativ geringen Mengen an 6-Pyridon, die nach der Identifizierung der Verbindung noch zur Verfügung standen, wurde ein orientierender in vivo Versuch durchgeführt. Das Bild der akuten 3-AP-Vergiftung war nicht zu beobachten. Wenn es demnach auch nicht sehr wahrscheinlich ist, daß 3-Acetyl-6-pyridon einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der 3-Acetylpyridinvergiftung hat, kann ein eigener Effekt des 6-Pyridons, der sich u.U. auch in anderen Stoffwechselstörungen ausdrücken könnte, vorerst noch nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

1.) Es wird über die Isolierung und Identifizierung von Metaboliten des 3-Acetylpyridin berichtet, die nach der Gabe von ^{14}C-3-Acetylpyridin mit dem Urin ausgeschieden werden.

2.) 25 % des applizierten 3-AP werden als 3-Acetyl-6-pyridon und 0,3 % als N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon ausgeschieden.

3.) Für Untersuchungen über die Verteilung von 3-Acetyl-6-pyridon im Organismus im Verlauf der 3-AP-Vergiftung wurde eine dünnschichtchromatographische Methode entwickelt. Mit dieser Methode war es möglich, den Gehalt an 3-Acetyl-6-pyridon quantitativ zu bestimmen. Untersucht wurden Leber, Niere, Gehirn, Milz, Blut und Urin. Das Maximum der 6-Pyridon-Bildung liegt in der 4. Stunde nach der Gabe von 3-AP. Nach 10 - 12 Stunden ist kein 6-Pyridon mehr in den Organen nachweisbar.

4.) 3-Acetylpyridin wird im Cytoplasma der Zellen zum 3-Acetyl-6-pyridon oxydiert.

5.) Nach wiederholter Injektion von 3-AP und ebenso nach Luminalvorbehandlung wird in allen Organen wesentlich weniger 6-Pyridon gebildet. Im Urin finden sich nur mehr 73,5 % bzw. 40,6 % der Menge an 6-Pyridon, die nach einmaliger Injektion von 3-AP gefunden wurden. Das ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß die Vorbehandlung zu einer Enzyminduktion in den Mikrosomen führt. Dadurch wird der Stoffwechsel des 3-AP in eine andere Richtung gelenkt, so daß vermehrt andere Metaboliten ausgeschieden werden können.

6.) Abschließend wird diskutiert, ob dem 3-Acetyl-6-pyridon eine eigene Wirkung bei der Ausbildung der 3-Acetylpyridinvergiftung zukommen könnte.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Beher, W.T., W.L.Anthony
Studies of antimetabolites. III. The metabolism of 3-acetylpyridine in vivo.
J.biol.Chem. 203, 895 (1953)

Beher, W.T., G.D.Baker, M.Madoff
Studies of antimetabolites. V. Metabolism in vivo of 3-acetylpyridine.
J.biol.Chem. 234,2388 (1959)

Beher, W.T., W.M.Holliday, O.H.Gabler
Studies of antimetabolites. II. 3-acetylpyridine.
J.biol.Chem. 198,573 (1952)

Beher, W.T., S.P.Marfey, W.L.Anthony, O.H.Gabler
Studies of antimetabolism. IV. The metabolism of 3-acetylpyridine in vitro.
J.biol.Chem. 205,521 (1953)

Burns, J.J., C.Evans, N.Trousof
Stimulatory effect of barbital on urinary excretion of L-ascorbic acid and nonconjugated D-glucuronic acid.
J.biol.Chem. 227,785 (1957)

Conney, A.H., E.C.Miller, J.A.Miller
The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat of 3-methylcholanthrene.
Cancer Res. 16,450 (1956)

Conney, A.H., C.Davison, R.Gastel, J.J.Burns
Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.
J.Pharmac.exp.Ther. 130, 1 (1960)

Conney, A.H., A.Klutch
Increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with phenobarbital and other drugs.
J.biol.Chem. 238, 1611 (1963)

Coper, H., H.Herken
Pharmakologische Analyse der 3-Acetylpyridinvergiftung
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 243, 291 (1962)

Herken, H.
Pharmakologische Untersuchungen zum Problem der selektiven Vulnerabilität des Gehirns
Arzneimittelf.: im Druck

Herken, H., Neuhoff
Mikroanalytischer Nachweis von Acetylpyridin-adenin-dinucleotid und Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat im Gehirn.
Z.phys.Chem. 331, 85 (1963)

Huff, J.W.
The fluorescent condensation product of N-methylnicotinamide and acetone. I. Synthesis and properties.
J.biol.Chem. 167, 151 (1947)

Isselbacher, K.J., J.Axelrod
Enzymatic formation of corticosteroid glucuronides
J.Amer.Chem.Soc. 77, 1070 (1955)

Kanig, K., W.Koransky, G.Münch, P.E.Schulze
Isolierung eines Metaboliten des 3-Acetylpyridins aus dem Gehirn und seine Identifizierung als Pyridin-3-Methylcarbinol.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 249, 43 (1964)

Kato, R.
Induced increase of meprobamate metabolism in rats treated with phenobarbital or phenaglycodol
Med.exp. (Basel) 3, 95 (1960)

Knox, W.E.
The quinine-oxidizing enzyme and liver aldehyde oxidase.
J.biol.Chem. 163, 699 (1946)

Knox, W.E., W.I.Grossman
The location of the reactive carbon in N-methylnicotinamide.
J.Amer.Chem.Soc. 70, 2172 (1948)

Leifer, E., L.J.Roth, D.S.Hogness, M.H.Corson
The metabolism of radioactive nicotinic acid and nicotinamide.
J.biol.Chem. 190, 595 (1951)

Lindenblad, G.E., M.Kaihara, J.M.Price
N-methyl-2-pyridon-5-carboxylic acid in human urine.
J.biol.Chem. 219, 893 (1955)

Magour, S.
Die Induktion reduzierender mikrosomaler Leberenzyme durch Phenobarbital.
Inaugural-Dissertation 1964

McKennis, H., L.B.Turnbull, E.R.Bowman
Additional routes in the metabolism of 3-acetylpyridine.
J.biol.Chem. 239, 1215 (1964)

Miller, E.C., J.A.Miller, R.R.Brown, J.C.McDonald
On the protective action of certain polycyclic aromatic hydrocarbons against carcinogenesis by aminoazo dyes and 2-acetylamino-fluorene.
Cancer Res. 18, 469 (1958)

Neuhoff, V.
Pharmakologische Untersuchungen zur lokalisierten Vulnerabilität des Gehirns.
Habilitationsschrift 1964

Neuhoff, V., F.Köhler
Isolierung von Pyridin-3-methyl-carbinol-glucuronid, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridins.
Naturwiss.: im Druck

Neuhoff, V., T.Harris
Isolierung und Identifizierung von Metaboliten des 3-Acetylpyridin.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 249, 11 (1964)

Neuhoff, V., T.Harris
Isolierung von 3-Acetyl-6-pyridon, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridins.
Naturwiss. 51, 290 (1964)

Perlzweig, W.A., F.Rosen, P.B.Pearson
Comparative studies in niacin metabolism. The fate of niacin in man, rat, dog, pig, rabbit, guinea pig, goat, sheep and calf.
J.of Nutr. 39/40, 453 (1949/50)

Rajagopalan, K.V., I.Fridovich, P.Handler
Hepatic aldehyde oxidase. I.Purification and properties.
J.biol.Chem. 237, 922 (1962)

Remmer, H.
Drugs as activators of drug enzymes.
Proceedings of the First International Pharmacological Meeting.
Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1962

Remmer, H.
Vermehrte Glucuronidierung von Sulfadimethoxin während und nach Phenobarbitalbehandlung bei Ratten.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 247, 461 (1964)

Remmer, H., H.J.Merker
Vermehrte Bildung von endoplasmatischem Reticulum in der Leberzelle unter der Wirkung von Arzneimitteln.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 245, 76 (1963)

Remmer, H., H.J.Merker
Vermehrung von "smooth"-Membranen und arzneimittelabbauenden Enzymen des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen bei der Behandlung mit verschiedenen Pharmaka.
Naturwiss. 21, 670 (1963)

Remmer, H., H.J.Merker
Drug-Induced changes in the liver endoplasmic reticulum association with drug-metabolizing enzymes.
Science 142, 1657 (1963)

Remmer, H., M.Siegert
Beschleunigter Arzneimittelabbau durch Enzyminduktion beim Hunde nach Behandlung mit Phenobarbital.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 247, 522 (1964)

Remmer, H., Siegert, W.Krause
Die Aktivierung des Arzneimittelabbaues durch Pharmaka.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 241, 549 (1961)

Willing, F., V.Neuhoff, H.Herken
Der Austausch von 3-Acetylpyridin gegen Nicotinsäureamid in den Pyridinnucleotiden verschiedener Hirnregionen.
Arch.exp.Path.u.Pharmak. 247, 254 (1964)

Wu Chang, M.L., B.C.Johnson
Nicotinic acid metabolism. III. C^{14}-Carboxyl-labeled nicotinamide and nicotinic acid in the chick.
J.biol.Chem. 226, 799 (1957)

Wu Chang, M.L., B.C.Johnson
N-methyl-4-pyridone-5-carboxamide, a new major normal metabolite of nicotinic acid in rat urine.
J.biol.Chem. 234, 1817 (1959)

Wu Chang, M.L., B.C.Johnson
Metabolism of C^{14}-nicotinic acid in Pig and sheep.
J.Nutr.(Philad.) 76, 512 (1962)

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Kaufmanns Richmond H a r r i s und seiner Ehefrau Ellen, geb. Crandell, wurde ich am 21. September 1933 in Long Beach, California (U.S.A.), geboren. Nach 8 Jahren Volksschule an der Bar V Ranch School in Nuevo, California, und 4 Jahren an der North Central High School in Spokane, Washington, habe ich von 1951 bis 1955 das Pomona College in Claremont, California, besucht und den "Bachelor of Arts"-degree in Geschichte erworben. Mit Hilfe eines Rockefeller Stipendiums ging ich anschließend nach New York City und studierte dort an der Columbia University zuerst 3 Semester Theologie im Union Theological Seminary und dann an der School of General Studies ein Semester Medizin. 1957 wurde das Studium durch die Einberufung zur U.S.Army (dreijährige Dienstzeit in einer Sanitätseinheit) unterbrochen. Im Juni 1959 habe ich die Kinderkrankenschwester Irmgard Sporer geheiratet.

Nach der Entlassung aus der Armee in Frühjahr 1960 in Landstuhl, Deutschland, setzte ich das Medizinstudium an der Universität des Saarlandes fort, wo ich im November 1960 das Vorphysikum und im April 1962 das Physikum bestand. Das erste klinische Semester habe ich in Homburg/Saar studiert. Seit dem Wintersemester 1962/63 war ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert.

Im Juni 1963 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Am 7 September 1965 habe ich in Berlin die ärztliche Prüfung bestanden.